

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ Ca, Mg И Al В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ АТОМНО-ЭМИССИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ

Изучено пространственное распределение некоторых жизненно необходимых элементов в высохших на пористой поверхности каплях биологической жидкости (БЖ) методом лазерной атомно-эмиссионной многоканальной спектроскопии. Подобраны оптимальные условия для создания модельных образцов, аналогичных реальным пробам биологических жидкостей (кровь, плазма крови). Достигнута (максимальная, приемлемая) схожесть физико-химических свойств разработанных стандартных образцов (СО) с анализируемыми БЖ. Приведена методика получения СО с использованием альбумина в качестве белка и осадителя (ортофосфата калия) для корректировки размера высыхающей капли. Проведено количественное определение кальция, магния и алюминия в БЖ и сравнение изменения содержания кальция в крови и плазме крови больных до и после операции. Продемонстрирована возможность контроля изменения содержания макроэлемента в БЖ пациентов. Показано, что предложенная методика количественного определения некоторых элементов позволяет оперативно выявлять отклонения в их содержании и своевременно корректировать лечение.

**Ключевые слова:** биологические жидкости; кровь; приповерхностная лазерная плазма; лазерная атомно-эмиссионная спектроскопия; сдвоенные лазерные импульсы; кальций; магний; алюминий; ортофосфат калия.

The paper presents a study into the spatial distribution of some vitally important elements in the drops of biological fluids (BF) dried on porous surfaces with the use of multichannel atomic-emission spectrometry. The optimum conditions have been selected for the development of a model and for the real probes of biological fluids (blood, blood plasma). A maximal similarity (correlation) has been attained between the physicochemical properties of the developed standard samples (SS) and the analyzed biological fluids. A method to obtain SS has been proposed using albumin as a protein and potassium orthophosphate as a sedimentation agent for correction of the size of drying drops. The content of calcium, magnesium, and aluminum in BF has been estimated quantitatively; changes in the content of calcium in blood and blood plasma of the patients before and after operations have been compared. The possibility to control changes in the content of macroelements in BF of the patients has been demonstrated. It has been shown that the methods put forward for quantitative estimations of some elements in BF enable one to reveal deviations in their content and to correct adequately the course of treatment.

**Key words:** biological fluids; blood; surface laser plasma; laser atomic-emission spectrometry; double laser pulses; calcium; magnesium; aluminum; potassium orthophosphate.

В последние годы анализ биологических объектов стал одной из основных областей применения инструментальных, в том числе спектральных, методов анализа. Такие исследования актуальны при диагностике врожденных патологий, экологически обусловленных заболеваний, профессиональных заболеваний, связанных со спецификой промышленного производства, и др.

Известно огромное влияние макроэлементов (кальций, калий, натрий, магний и др.) и микроэлементов (цинк, медь, железо и др.) на функционирование организма и состояние здоровья. Становится все

более очевидно, что при возникновении многих патологий возникает дисбаланс в распределении этих физиологически значимых элементов [1–3].

Вместе с тем клинически идентифицировать воздействие окружающей среды в конкретный момент и на конкретного человека весьма сложно и не всегда представляется возможным. В связи с этим в практической медицине особое значение приобретает разработка методов ранней диагностики накопления и распределения указанных химических элементов в организме человека. При этом в большинстве случаев исследуется состав биологических жидкостей (БЖ) [4].

Целью настоящей работы является разработка новых методик количественной оценки не только общего содержания, но и локального пространственного распределения жизненно необходимых (эссенциальных) элементов в высохшей капле биологической жидкости. Результаты таких оценок могли бы стать основой при проведении диагностических исследований пациентов особенно на начальных стадиях развития болезни, поскольку обычные лабораторные показатели общего содержания макроэлементов в БЖ чаще всего лежат в пределах физиологической нормы.

Для оценки локального содержания элементов в различных точках высохшей капли биологической жидкости методами атомно-эмиссионной спектроскопии необходимо иметь в наличии стандартные образцы (СО), адекватные реальным образцам. Методы приготовления стандартных образцов для различных групп биологических объектов (твердых – волосы, ногти; жидких – кровь, плазма, спинномозговая жидкость и др.) различны, но во всех случаях идеальные стандарты должны отличаться от проб только содержанием определяемых элементов. Технология изготовления, геометрия и размер образцов, физико-химические свойства стандартов анализируемых проб должны быть по возможности одинаковы. Любые, даже самые малые отклонения могут привести к существенным различиям в градуировочных графиках, т. е. СО для спектрального анализа должны быть адекватны как по химическому составу, так и по физическим свойствам.

В нашем случае соответствием физическим свойствам нужно считать равенство диаметра высохшей капли образца и стандарта при одинаковом первоначальном объеме жидкости.

Ранее нами было показано, что, используя метод осадочной хроматографии, возможно стабильно регулировать размер капли, высохшей на пористой подложке [5]. В качестве органического вещества при создании модельного и стандартных образцов нами использовался белок куриного яйца, который на 70 % состоит из альбумина.

Сравнивали зоны распределения кальция в высохших на пористой поверхности каплях биологических жидкостей (кровь, плазма крови) и в полученном нами модельном образце без применения и при использовании ортофосфата калия в качестве осадителя.

Методика приготовления образцов следующая. Каплю водного раствора 10 %-го ортофосфата калия объемом 10 мкл микропипеткой наносили на поверхность бумажного фильтра (черная лента) диаметром 20 мм. Процесс сушки вели при температуре 40 °С и относительной влажности воздуха 30–35 % в течение примерно 5 мин. Затем поверх высушенной соли наносили каплю водно-солевого раствора альбумина объемом 10 мкл определенной концентрации. Нами были использованы водно-солевые растворы альбумина с добавлением хлоридов анализируемых металлов (Ca, Mg и Al) концентрациями 0,005; 0,01; 0,02; 0,04; 0,08 и 0,16 % по металлу.

Анализировали суммарные результаты действия 10 последовательных сдвоенных лазерных импульсов (СЛИ). Энергия лазерного излучения составляла 58 и 42 мДж (первый и второй импульсы соответственно), временной интервал между сдвоенными импульсами – 8 мкс. Абляция осуществлялась через 0,6 мм. Размер точки повреждения порядка 0,10–0,15 мм. По диаметру пробы проводился анализ в 30 точках поверхности [6].

### Обсуждение результатов

На рис. 1 представлена зависимость интенсивности линий Ca II (393,366 нм) в спектрах реальных образцов БЖ и модельного образца от положения точки абляции при использовании ортофосфата калия в качестве осадителя. Модельный образец представляет собой 0,5 %-й водный раствор альбумина с добавкой хлористого кальция при концентрации кальция – 0,1 %.

При сравнении зон распределения кальция в образцах крови и плазмы крови явно видно, что использование осадителя резко уменьшает размер зоны распределения и, что самое главное, они по размерам становятся практически равными между собой в обоих видах БЖ. При сравнении полученных данных с данными для модельного образца видно, что размер зоны в модельном образце со следующим порядком нанесения растворов: ортофосфат калия, раствор смеси хлорида кальция с альбумином – практически адекватен реальным образцам.

На рис. 2 представлены зависимости интенсивности линии Ca II в спектрах высушенных капель раствора альбумина от положения точки по диаметру при различной концентрации рассматриваемого элемента. Чтобы полученные результаты были объективными, определение проводили не менее трех раз (см. рис. 2, а–в) для каждой концентрации.

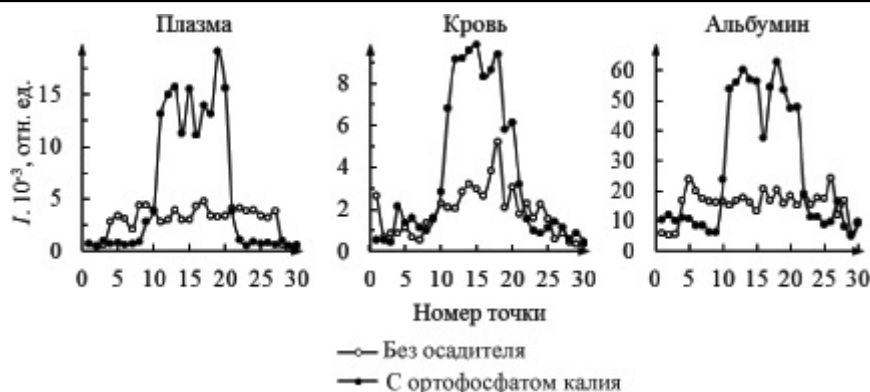


Рис. 1. Интенсивности линий Ca II (393,366 нм) в спектрах реального и модельного образцов

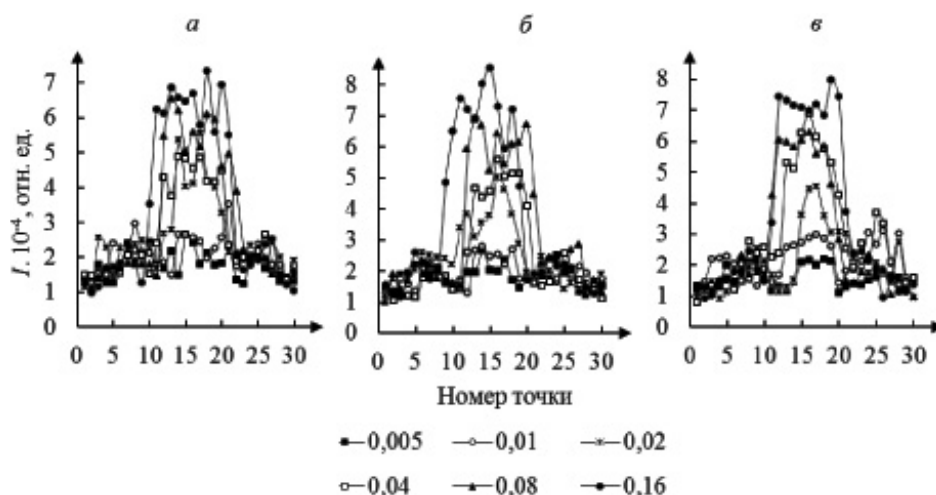


Рис. 2. Распределение интенсивностей линии Ca II (393,366 нм) по диаметру в спектрах высушенных капель альбумина при добавлении хлорида кальция различной концентрации (в %)

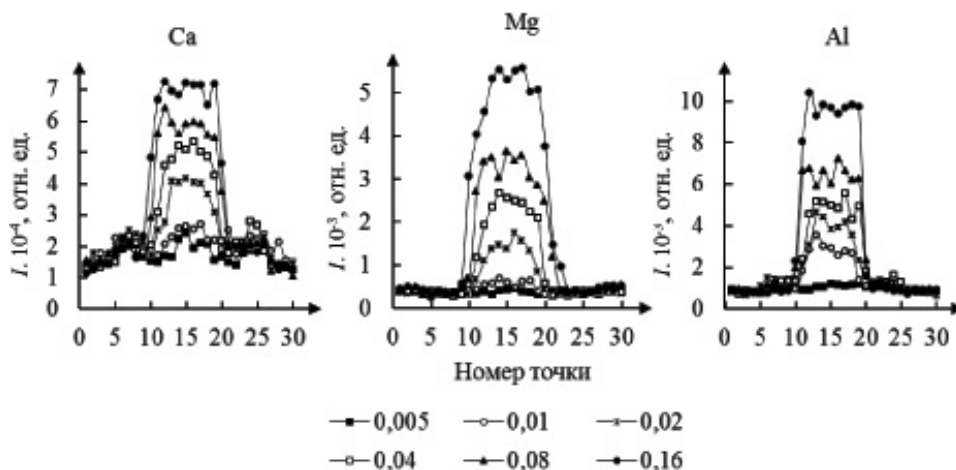


Рис. 3. Зависимость средней интенсивности линий Ca II (393,366 нм), Mg I (383,829 нм) и Al I (396,152 нм) в спектрах высушенных капель альбумина от концентрации элемента (в %)

Приведенные графики демонстрируют закономерное увеличение интенсивности спектральных линий с увеличением концентрации кальция. Незначительные различия для одной и той же концентрации в приведенных трех параллельных опытах лежат в пределах погрешности эксперимента.

Аналогичные изменения интенсивности наблюдаются также в спектрах для линий Mg и Al. В данном случае при использовании ортофосфата калия  $K_3PO_4$  в качестве осадителя катионы кальция, магния, алюминия распределены в зоне пористой подложки по диаметру, равному примерно  $6 \div 7$  мм [7].

Для более точной оценки зависимости интенсивности спектральных линий анализируемых элементов от концентрации при построении градуировочных графиков нами рассчитаны средние величины интенсивностей в трех последовательных измерениях для случая каждой концентрации.

На рис. 3 представлены усредненные графики изменения интенсивности от концентрации для кальция, магния и алюминия.

Используя полученные данные, нами построены градуировочные графики для определения концентрации кальция, магния и алюминия в анализируемых образцах биологических жидкостей.

Поскольку небольшие количества кальция присутствуют как в дистиллированной воде, используемой для приготовления растворов, так и в бумажных фильтрах, градуировочные графики для кальция строили с вычитанием фоновой подставки (средние значения интенсивности, взятые по краям, см. на рис. 3). На рис. 4 представлены градуировочные графики для определения концентрации Са II в образцах альбумина по величине интенсивности его линий методом ЛАЭС. Используются средние значения интенсивностей линии Са II (см. рис. 3).

Для более детальной иллюстрации зависимости интенсивности линии Са II от концентрации в логарифмических координатах нами также показаны возможные максимальные и минимальные значения интенсивностей.

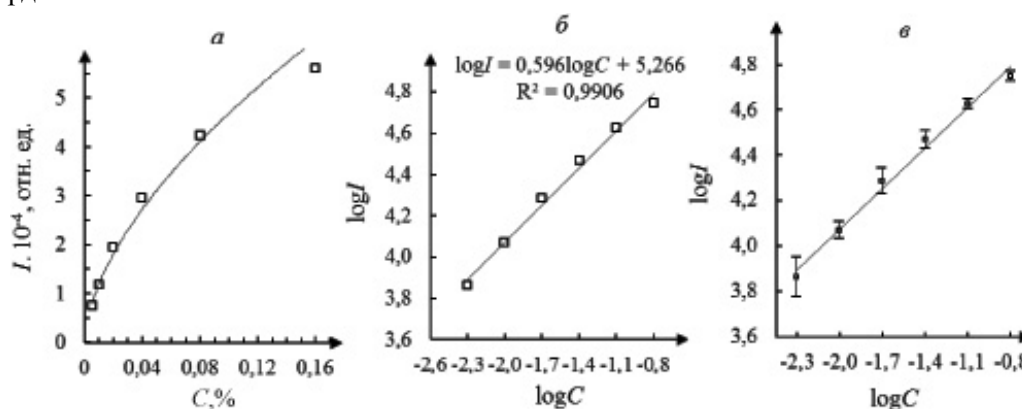


Рис. 4. Градуировочные графики для определения концентрации кальция в образцах БЖ по интенсивности линии Са II (393,366 нм)

Видно, что в обычных координатах ( $I$ ,  $C$ ) кривая роста имеет форму степенной функции (рис. 4, а), соответствующей эмпирическому уравнению Ломакина – Шайбе [8]:

$$I = aC^b.$$

В то же время эта зависимость прямолинейна в логарифмических координатах (рис. 4, б). Как видно из приведенного графика и уравнения, полученного методом наименьших квадратов, зависимость имеет линейный вид с коэффициентом корреляции, близким к единице ( $R^2 = 0,9906$ ). Таким образом, концентрацию кальция в БЖ можно определять по уравнению

$$\log C_{\text{Ca}} = \frac{\log I_{\text{Ca}} - 5,266}{0,596},$$

где  $C_{\text{Ca}}$  – концентрация кальция в анализируемой БЖ;  $I_{\text{Ca}}$  – средняя интенсивность эмиссионной линии Са II в одной точке на пробе.

Аналогичные градуировочные графики построены для определения концентрации магния и алюминия по результатам, приведенным на рис. 3. Зависимость интенсивности линий от концентрации для всех элементов имеет линейный вид с коэффициентом корреляции, близким к единице ( $R^2 \approx 0,99$ ).

Для оценки точности полученных результатов в каждом случае вычислялись коэффициент корреляции  $R$ , стандартное отклонение  $\sigma$  и доверительный интервал концентрации  $\Delta C$  полученной аппроксимации. При этом использован уровень доверительной вероятности  $P = 0,99$  [9].

Полученные значения коэффициента корреляции  $R$ , стандартного отклонения  $\sigma$  и доверительного интервала концентрации  $\Delta C$  градуировочных графиков для анализируемых элементов приведены в таблице.

Величины коэффициента корреляции  $R$ , стандартного отклонения  $\sigma$  и доверительного интервала концентрации  $\Delta C$  градуировочных графиков

Элемент	$n$	$\nu$	$P$	$t(P, \nu)$	$R$	$\sigma(I)$	$\Delta C, \%$
Кальций	30	27	0,99	2,472 66	0,990 6	2123	0,000 596
Магний	30	27	0,99	2,472 66	0,994	177	0,001 105
Алюминий	30	27	0,99	2,472 66	0,986 6	401	0,000 041

Таким образом, используя стандартные образцы и измеряя интенсивности эмиссионных линий для каждого элемента, можно определить его концентрацию в анализируемой БЖ, так, например, для кальция по уравнению

$$\log C_{Ca} = \frac{\log I_{Ca} - 5,266}{0,596},$$

где  $\Delta C_{Ca} = 5,96 \cdot 10^{-4} \%$ .

По разработанной методике мы провели определение общего содержания макроэлементов в цельной крови и плазме крови. Образцы готовили по аналогии с приготовлением стандартных образцов. Методика выглядит следующим образом. Каплю 10 %-го водного раствора ортофосфата калия объемом 10 мкл наносили на поверхность бумажного фильтра (черная лента) диаметром 20 мм, высушивали при температуре 40 °С в течение примерно 5 мин. Затем поверх высушенной соли наносили каплю цельной крови или плазмы объемом 10 мкл. Образцы высушивали при вышеуказанных условиях.

Использовали режимы работы установки, как и при построении градуировочных графиков в случае стандартных образцов.

Объектами исследований были образцы цельной крови и плазмы крови больных с онкологией центральной нервной системы (ЦНС) до и после операции. Из найденных средних значений интенсивностей по уравнению (2) нами была рассчитана концентрация кальция в каждом образце цельной крови и плазмы. Полученные результаты представлены на рис. 5, где К. №2 и П. №2 – кровь и плазма крови больного №2 до операции, а К. №2а, П. №2а – после операции. (Для сравнения на рис. 5 приводятся показатели больного №3 после операции: соответственно К. №3а и П. №3а.)

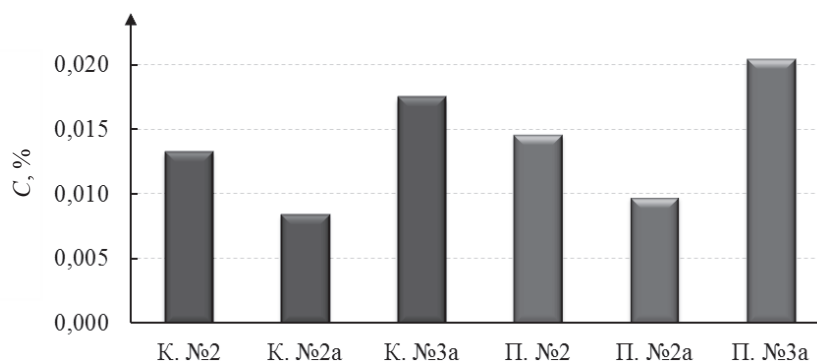


Рис. 5. Концентрация кальция в крови и плазме нескольких больных, определенная методом двухимпульсной ЛАЭС в высохших каплях

В норме концентрация общего кальция в цельной крови составляет 2,35 ммоль/л (0,009 4 %), а в плазме – 2,4 ммоль/л (0,009 6 %) [10, 11]. Из рис. 5 видно, что концентрации кальция в плазме и цельной крови, определенные методом двухимпульсной ЛАЭС, вполне согласуются с концентрацией в норме. Более того, из сравнения результатов для пациента №2 видно, что после проведения операции концентрация кальция уменьшается, приближаясь к функциональной норме. Очевидны изменения, которые можно контролировать в процессе дальнейшего лечения.

Таким образом, разработанная нами методика позволяет оперативно выявлять отклонения в содержании жизненно необходимых элементов в БЖ пациентов и своевременно корректировать их лечение.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Курец Н. И. Роль дисбаланса химических элементов в формировании хронической патологии у детей // Медицинские новости. 2006. № 2. С. 7–17.
2. Лихачев С.А., Нечипуренко Н. И., Пашковская И. Д., Булойчик Ж. И. Микро- и макроэлементы крови у больных с острой ишемией головного мозга при макроангиопатии // Актуальные проблемы неврологии и нейрохирургии. 2009. Вып.12. С. 233–239.
3. Нечипуренко Н. И., Верес А. И., Василевская Л. А., Пашковская И. Д. Содержание микроэлементов в крови и состояние кожной микрогемодинамики у пациентов с дисциркуляторной энцефалопатией при использовании мексидола в комплексном лечении // Неврология и нейрохирургия в Беларуси. 2011. № 3 (11). С. 98–108.
4. Максимов С. А. Морфология твердой фазы биологических жидкостей как метод диагностики в медицине // Бюллетень сибирской медицины. 2007. № 4. С. 80–85.
5. Чинь Нгок Хоанг, Патапович М. П., Фам Уиен Тхи, Пашковская И. Д., Булойчик Ж. И., Зажогин А. П. Влияние физико-химических свойств фосфатов калия на распределение катионов Са, Mg и Al в высохших каплях альбумина методом локальной лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии // Вестн. БГУ. Сер. 1. 2012. № 3. С. 12–15.
6. Чинь Нгок Хоанг, Фам Уиен Тхи. Исследование влияния ортофосфатов К на пространственное распределение катионов Са, Mg и Al при высыхании на бумажных фильтрах капель крови и плазмы методом лазерной атомно-эмиссионной

спектрометрии // Материалы XXI Междунар. науч.-практ. конф. асп., магистр. и студ. «Физика конденсированного состояния» (Гродно, 18–19 апр. 2013 г.). Гродно, 2013. С. 229–230.

7. Чинь Нгок Хоанг, Фам Уиен Тхи, Танин А. Л., Щеголев А. В., Булойчик Ж. И., Маслова Г. Т. Исследование влияния ортофосфатов К на пространственное распределение катионов Са, Mg и Al в высушенных на бумажных фильтрах каплях белка методом локальной лазерной атомно-эмиссионной спектрометрии // Материалы II Междунар. науч.-практ. конф. «Прикладные проблемы оптики, информатики, радиофизики и физики конденсированного состояния», посвящ. 110-летию со дня рожд. акад. А. Н. Севченко (Минск, 27–28 февр. 2013 г.). Минск, 2013. С. 248–249.

8. Зайдель А. Н. Основы спектрального анализа. М., 1965.

9. Зажогин А. П. Атомный спектральный анализ: курс лекций. Минск, 2005.

10. Тюльпаков А.Н., Павлов А.А., Разумовский А.Ю., Петрайкина Е.Е., Витебская А.В. Случай тяжелого неонатального гиперпаратиреоза, обусловленный дефектом кальциевого рецептора // Проблемы эндокринологии. 2010. Т. 56, № 4. С. 27–33.

11. Бабурин И.Н., Дубинина Е.Е., Кирьянова В.В., Гончарова В.Г., Соколян Н.А. Минеральный состав крови при невротических расстройствах // Вестн. психотерапии. 2011. № 39. С. 18–27.

Поступила в редакцию 20.12.13.

**Чинь Нгок Хоанг** – заведующий кафедрой «Технология электротехники, электроники» университета Винь (Вьетнам).

**Фам Уиен Тхи** – студентка 5-го курса физического факультета.

**Лэ Тхи Ким Ань** – магистрант кафедры лазерной физики и спектроскопии. Научный руководитель – доктор физико-математических наук, профессор кафедры лазерной физики и спектроскопии А. П. Зажогин.

**Мария Николаевна Трущенко** – научный сотрудник РНПЦ неврологии и нейрохирургии.

**Жанна Игнатьевна Булойчик** – кандидат химических наук, старший научный сотрудник кафедры физической оптики.